

# ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS METODOS DE TILLMANS Y DE ROE, PARA LA VALORACION DEL ACIDO ASCORBICO

Por I. PENNACCHIOTTI M.

## SUMMARY

A comparative study of the Tillmans and Roe's methods for evaluation of ascorbic acid is made. It has been found that the titration with 2,4-dinitrophenylhydrazine gives good results when used in fresh vegetables containing ascorbic and dehydroascorbic acids.

Muchos son los métodos químicos que se han estudiado para la valoración del ácido ascórbico en tejidos, líquidos biológicos y alimentos.

Los métodos colorimétricos, que se basan en la reducción del ferricianuro de potasio (Tauber y Kleiner), del ácido molibdíco, fosfotúngstico (Bezssonoff) y del ácido 18-fosfotúngstico (Medes) o en la producción de furfural (Roe), han tenido una aplicación limitada y no ofrecen ventajas sobre los que se basan en la titulación por el 2,6 dicloro-fenol-indofenol (Tillmans) o en la producción de color entre el ácido sulfúrico y la osazona del ácido dehidroascórbico (Roe y col.) (1).

Como los dos últimos métodos son los más corrientes hemos considerado de interés estudiar las ventajas del segundo de ellos para ser aplicado en los trabajos diarios de laboratorio.

El método de Tillmans se basa en valorar la vitamina C al estado de ácido ascórbico, defecando previamente el extracto ácido (tricloroacético, oxálico o metafosfórico) con solución de acetato de mercurio al 20 por 100, el que, junto con eliminar las sustancias colorantes y reductoras, lo transforma en ácido dehidroascórbico. Este ácido se reduce luego a ascórbico, mediante una corriente de hidrógeno sulfurado, y una vez eliminado éste se procede a la titulación con el reactivo de Tillmans, cuyo título ha sido determinado previamente por medio de una solución conocida de ácido ascórbico puro.

Por su parte el método colorimétrico de Roe y col. (2) se basa en valorar el ácido dehidroascórbico, previa transformación del ácido ascórbico por medio del carbón Norit A activado. El ácido resultante se copula con

la 2-4 dinitrofenil-hidracina, dando un precipitado de color amarillo anaranjado (osazona) que es proporcional al contenido de vitamina y que se disuelve en ácido sulfúrico, comunicando a éste su color. Ahora bien: el color obtenido se mide en un colorímetro —en nuestro caso se usó un espectrofotómetro Coleman universal, modelo 14—, determinándose la concentración mediante una curva preparada a base de soluciones tipos sometidas al mismo tratamiento de los extractos problemas.

En la valoración espectrofotométrica es de enorme importancia la adición de tiourea, ya que ella impide la interferencia de otras sustancias oxidantes (3, 4). En este caso se usó disuelta directamente en el reactivo cromógeno y, por otra parte, en el carbón suspendido en el mismo ácido que sirvió para preparar las muestras problemas, en vez de agregarlo directamente como se indica en algunos tratados.

Damos a continuación los resultados obtenidos por los dos métodos en muestras de lechuga y jugo de limón:

	Número de muestras	Método de Tillmans	Método Roe y colaboradores
Lechugas ... ..	14 T. M.	11,5 mg./100 g.	10,5 mg./100 g.
Jugo de limón ... ..	7 T. M.	60,8 mg./100 c. c.	59,3 mg./100 c. c.

De los resultados expuestos se deduce que los dos métodos no presentan diferencias significativas. Por el método de Roe y col. presenta algunas ventajas sobre el de Tillmans, razones por las cuales fué adaptado en nuestros trabajos diarios y que son las siguientes:

1.<sup>o</sup> Permite el trabajo en serie en forma más práctica y conveniente que el método de Tillmans.

2.<sup>o</sup> Elimina el uso del hidrógeno sulfurado, gas tóxico y molesto en los trabajos diarios.

3.<sup>o</sup> Resulta más económico y es más rápido que el volumétrico.

4.<sup>o</sup> El color amarillo anaranjado es estable por veinticuatro horas y en él no interviene el factor personal del viraje como sucede en el método de Tillmans, cuyo límite requiere una práctica más o menos intensa.

Durante el Symposium de Bromatólogos de Latino-América, realizado en Santiago en el mes de septiembre del año recién pasado, se indicó que era más práctico transformar el ácido ascórbico en dehidroascórbico, con bromo. A través de nuestros estudios se observó que, si bien es cierto, esta modificación trae consigo un acortamiento del trabajo, ya que elimina una centrifugación y una filtración, se comprobó que los resultados con bromo fueron siempre más altos que los obtenidos con la suspensión de carbón. En efecto, el trabajar con soluciones conocidas de ácido ascórbico, se obtuvieron los siguientes resultados:

Contenido real	100 mg./100 c. c.	30 mg./100 c. c.	20 mg./100 c. c.	10 mg./100 c. c.
Con carbón activado.....	99,0 mg./100 c. c.	30,0 mg./100 c. c.	18,9 mg./100 c. c.	10,8 mg./100 c. c.
Con bromo ..	102,0 mg./100 c. c.	32,5 mg./100 c. c.	22,0 mg./100 c. c.	12,0 mg./100 c. c.

Por considerar los resultados obtenidos con la suspensión de carbón más exactos, se realizó el estudio del contenido en ácido ascórbico en diferentes verduras y frutas consumidas en Santiago, por el método original de Roe (2) adaptado al espectrofotómetro, y que es el que actualmente se sigue en los laboratorios de Bromatología de la Facultad de Química y Farmacia y en los laboratorios de Química y Forrajes del Instituto de Investigaciones Veterinarias dependiente del Ministerio de Agricultura.

CUADRO COMPARATIVO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LA CATEDRA DE BROMATOLOGIA Y LOS DATOS POR OTROS AUTORES

VERDURAS	Núm. de muestras	Cátedra de Bromatología (5,6)	L. Raudoin (7)	R. Casares (8)	Clavera (9)
1. <i>Acelga</i>					
Cruda lav. ... ..	50	30,8	—	11-35	—
Cocidas vap. ... ..	50	5,2	—	—	—
2. <i>Berro</i> (10) ... ..	21		—	—	—
3. <i>Coliflor</i> (11)					
Cruda ... ..	50	79,4	—	60	40-50
Cocidas ... ..	50	42,6	—	—	—
4. <i>Alcachofas</i>					
Cocidas ... ..	10	2,3	4,0	—	—
Tallos ... ..	10	0,0	—	—	—
5. <i>Espinacas</i>					
Cruda lav. ... ..	50	79,7	—	60	—
Cocidas vap. ... ..	50	6,6	—	—	—
6. <i>Lechuga</i>					
Francesa ... ..	7	15,0	—	12	—
Milanesa ... ..	7	15,7	—	—	—
7. <i>Zapallos</i>					
Crudos ... ..	6	12,2	—	—	—
Cocidos ... ..	6	9,9	—	—	—
Horno ... ..	5	8,4	—	—	—
8. <i>Zapallitos it.</i>					
Crudos ... ..	9	55,2	—	—	—
Al horno ... ..	4	8,5	—	—	—
9. <i>Habas</i>					
Cocidas ... ..	10	7,2	—	—	—
10. <i>Arvejas</i>					
Cocidas ... ..	10	0,0	—	—	—

VERDURAS	Número de muestras	Cátedra de Bromatología (5,6)	R. Randola (7)	R. Casares (8)	Clavera (9)
11. Zanahoria					
Cruda ... ..	3	3,38	2,6	34	—
12. Alfalfa (12)					
Verde ... ..	57	103,3	—	—	—
Heno ... ..	50	6,6	—	—	—
13. Trébol (12) ... ..	51	75,7	—	—	—
<b>FRUTAS.</b>					
1. Jugo de limón					
Eureka ... ..	50	57,5	—	—	—
Común ... ..	50	70,0	65,0	60,7	—
Sutil ... ..	50	54,4	—	—	—
2. Naranjas					
Chilenas ... ..	50	77,2	145,0	43,62	60-70
Thompson ... ..	50	61,6	—	—	—
3. Manzanas ... ..	12	5,6	2,2	7,0	—
4. Uvas ... ..	14	3,6	4,0	—	2-3
5. Higos secos ... ..	10	2,3	—	—	—
6. Pasas ... ..	10	7,7	—	—	—
7. Tomates					
Var. lisa ... ..	—	—	—	—	—
C/cáscara ... ..	7	24,5	33	—	13
S/cáscara ... ..	7	17,2	—	—	—
Var. rugosa ... ..	—	—	—	—	—
C/cáscara ... ..	3	9,5	—	—	—
S/cáscara ... ..	3	7,5	—	—	—

### CONCLUSIONES

La valoración colorimétrica del ácido ascórbico, mediante la 2,4 dinitro-fenil-hidracina, ha demostrado ser un método seguro para ensayos antiescorbúticos de muchos alimentos frescos cuando el ácido ascórbico y el dehidro-ascórbico se encuentran presentes y el ácido diketogulónico no se haya formado en cantidades apreciables. Si se desea un alto grado de especificidad se pueden determinar los tres componentes de la vitamina C por separado, debiendo, en este caso, prolongarse a seis horas el tratamiento con la 2,4 dinitro-fenil-hidracina.

Se prefirió al espectrofotómetro, para la lectura final, la longitud de onda de 520 milimicras que permite eliminar las interferencias de osazonas que pueden formarse por glúcidos presentes en las muestras (13).

Del cuadro comparativo no se pueden obtener conclusiones completas, porque los autores citados no indican métodos empleados, y en cuanto a las verduras, ellas han sido estudiadas, en su mayoría, crudas; en cambio,

nosotros tratamos de analizarlas acercándonos lo más posible a la forma como son ingeridas por el hombre.

Santiago de Chile.

*Cátedra de Bromatología de la Facultad  
de Química y Farmacia.  
Prof. Dr. Hermann Schmidt Hebbel.*

#### BIBLIOGRAFÍA

1. VILLELA, G. G.: *Métodos de dosificación. Vitaminas*, pág. 179. Ed. El Ateneo, Buenos Aires, 1948.
2. H. SCHMIDT HEBBEL: *Tratado de Bromatología*, pág. 323. Ed. El Imparcial, Santiago de Chile, 1953.
3. ROE y KOETHER (1942-43), LOWERY, LÓPEZ y BESSEY (1945), MILLAS y ROE (1947): *Manual of Standardized for Spectrophotometric Chemistry*, págs. 46, 1; 46, 6. Ed. Standard Scientific Supply. Corp. New York, 1951.
4. *Manual of Standardized Procedures for Spectrophotometric Chemistry*, 1951.
5. Cátedra de Bromatología de la Facultad de Química y Farmacia, U. de Chile: «Composición química de frutas y verduras de más consumo en la ciudad de Santiago». *Symposium de Bromatólogos de Latino América*. Santiago, Chile, 1954. (Estos ANALES.)
6. Cátedra de Bromatología de la Facultad de Química y Farmacia, U. de Chile: *Segunda contribución al estudio de frutas y verduras de mayor consumo en la ciudad de Santiago* (inédito).
7. LUCIE RANDOIN: *Vues actuelles sur le probleme de l'alimentation*. París, 1937.
8. CASARES LÓPEZ, R.: *Química de alimentos*, Ed. Saeta, Madrid, 1942.
9. C. CLAVERA: *Problemas de la alimentación*. Granada, 1937.
10. DONOSO, G.: *Valoración espectrofotométrica del ácido ascórbico, caroteno y vitamina E, en diversas variedades de berros. Tesis de prueba para optar al título de Químico Farmacéutico*. Fac. de Química y Farmacia, 1954 (en prensa).
11. PODESTÁ, O.: *Composición química de la coliflor. Tesis de prueba para optar al título de Químico Farmacéutico*. Fac. de Química y Farmacia, 1954 (en prensa).
12. YANSSSENS GABRIELA: *Valoración espectrofotométrica de la vitamina C en alfalfa, heno de Alfalfa y trébol y de carotenos en trébol. Tesis de prueba para optar al título de Químico Farmacéutico*. Fac. de Química y Farmacia. U. de Chile, 1954 (en prensa).
13. *Vitamin Assay*. Second Ed. Int. Publ. Inc. New York, pág. 93, 1951.